

THESIS

BONN

1969

VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT AUF ORGANE UND
ZELLFRAKTIONEN DER VESICULAR-DRÜSEN UNREIFER RATTEN
NACH APPLIKATION SUBPHYSIOLOGISCHER DOSEN
TESTOSTERON -4-¹⁴C

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Rolof | Kley
aus Berlin

Bonn 1969

VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT AUF ORGANE UND
ZELLFRAKTIONEN DER VESICULAR-DRÜSEN UNREIFER RATTEN
NACH APPLIKATION SUBPHYSIOLOGISCHER DOSEN
TESTOSTERON $-4-^{14}\text{C}$

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Rolof Kley
aus Berlin

Bonn 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. K.-O. Mosebach
Korreferent: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1969

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. F. Zilliken

Herstellung: R. Schwarzbald, 5301 Witterschlick b. Bonn

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Einführung	4
Theoretischer Teil	5
Experimenteller Teil	10
A. Methodik	
1. Tiere und Injektionen	10
2. Aufarbeitung der Tiere	10
3. Zellfraktionierung der Vesicular-Drüsen	11
4. Bestimmung des Proteingehaltes der Cyto- plasmafraktion (Biuret-Reaktion)	12
5. Radioaktivitätsbestimmungen	16
a.) Messung der ^{14}C -Aktivität in Gasphase	16
aa.) Verbrennung nach SIMON	16
bb.) Verwendung von Gasfüllzählrohren in Antikoinzidenz-Schirmzählrohren	18
b.) Flüssig-Szintillator-Technik	20
6. Auswertung	
B. Ergebnisse	
1. Zeitlicher Verlauf der Radioaktivitätsver- teilung ohne Organfraktionierung bei	30
a.) subphysiologischer Dosierung	30
b.) physiologischer Dosierung	34
2. Radioaktivitätsverteilung auf die Zell- fraktionen von Vesicular-Drüsen zu ver- schiedenen Zeitpunkten nach Applikation	34
Diskussion	40
Zusammenfassung	44
Literaturverzeichnis	46

Einführung

Wesentliche Voraussetzung für die Klärung des Wirkungsmechanismus eines Hormons ist Kenntnis seines Schicksals im Säugetierorganismus. Hierzu gehört zunächst die Kenntnis seiner Verteilung und seiner Bindungen. Im eigenen Arbeitskreis dient das Steroidhormon Testosteron als Studienobjekt. Bei bisherigen Verteilungsstudien mit Mengen dieses Hormons, die als physiologisch gelten, war keine Anreicherung in den Erfolgsorganen gegenüber Blut zu beobachten. Darüberhinaus wurde das applizierte Hormon und seine Metabolite bevorzugt im Cytoplasmaraum und nur im geringen Ausmaß in den Kernen wiedergefunden. Andere Arbeitskreise fanden demgegenüber nach Einsatz von Östradiol in weiblichen Tieren deutliche Anreicherung in Uterus und Vagina. Ein hoher Prozentsatz dieses Hormons wurde in den Kernen aufgefunden. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel zu klären, ob mit Testosteron auch in männlichen Erfolgsorganen Anreicherung und Bevorzugung der Kerne erreicht werden, wenn dem Östradiol entsprechend wesentlich kleinere Mengen Testosteron appliziert werden und in einem breiteren Maße als bisher die Zeitspanne zwischen Injektion und Sektion variiert wird.

Theoretischer Teil

Viele Hormone im Säugetierorganismus gehören zur Gruppe der Steroide, die aus Cholesterinderivaten synthetisiert werden. Hauptproduktionsstätten sind die Sexualorgane und die Nebennierenrinden. Die Biosynthese der Sexualhormone, die zur Gruppe der C_{19} - und C_{18} -Steroide zählen, erfolgt über C_{21} -Steroide, zu denen auch das Corpus-luteum-Hormon Progesteron gehört. Wir wissen, daß über 17 α -Hydroxyprogesteron nach Abspaltung der Seitenkette das Androsten-3,17-dion und weiter durch Reduktion an C_{17} das Testosteron entsteht (1). Beide androgenwirkenden C_{19} -Steroide werden in den LEYDIG'schen Zwischenzellen des Hodens im männlichen Organismus gebildet. Die Östrogene (C_{18} -Steroide), die sich chemisch in charakteristischer Weise von den Androgenen und vom Progesteron durch den aromatischen Ring A im Steroidgerüst unterscheiden, werden höchstwahrscheinlich aus Testosteron synthetisiert und zwar vorwiegend in den Eierstöcken. Als Transportorgan für die Hormone allgemein fungiert das Blutplasma. Die hier interessierenden Erfolgsorgane für die männlichen Sexualhormone sind die akzessorischen Sexualorgane Prostata und Vesicular-Drüsen, die mit den weiblichen Sexualorganen Uterus und Vagina verglichen werden.

Die Verteilung der einzelnen Sexualhormone zeigt nach Applikation ein unterschiedliches Bild:

- 1) Progesteron wird bei weiblichen Ratten im Hypophysenvorderlappen und in der Nebennierenrinde besonders angereichert. Uterus und Vagina werden gegenüber Blut kaum bevorzugt (2).
- 2) Auch die Androgene zeigten bei unreifen Tieren bisher ebenfalls keine besondere Anreicherung gegenüber Blut. Bevorzugte Aufnahme bzw. Bindung erfahren sie in Leber, Niere, Nebenniere und Lunge (3,4). Verteilungsstudien von TVETER (5) bei erwachsenen kastrierten Tieren führ-

ten zur Feststellung, daß zwei bis drei Stunden nach Applikation von radioaktivem Testosteron vor allem Prostata eine bevorzugte Aufnahme des radioaktiven Materials erfährt.

- 3) Die einzelnen Oestrogene verhalten sich unterschiedlich. Uterus, Vagina und Hypophysenvorderlappen enthalten offensichtlich spezifische Rezeptoren für Östradiol (6). Es tritt einige Stunden nach Applikation in diesen Organen eine starke Anreicherung gegenüber Blut auf. In-vivo-Studien über die intrazelluläre Verteilung von Östradiol im Uterus-Endometrium führten zur Entdeckung einer bevorzugten Bindung in den Kernen (7). Die anderen Oestrogene bieten merkwürdigerweise keine Besonderheiten.

Wie aus dieser Übersicht über die hormonale Verteilung der Sexualhormone zu ersehen ist, zeigt Östradiol im weiblichen Organismus ein völlig anderes Verhalten als die übrigen Sexualhormone. Während Testosteron schon 15 min. nach Applikation in den Erfolgsorganen Prostata und Vesicular-Drüsen (8) in 5 α -Dihydrotestosteron und einige nicht identifizierte polare Metabolite umgewandelt wird, findet sich in Uterus und Vagina sechs Stunden nach Injektion von radioaktivem Östradiol fast ausschließlich unverändertes Östradiol (9). Da sowohl die männlichen als auch die weiblichen Steroidhormone auf die akzessorischen Geschlechtsorgane einen gut meßbaren Wachstums- und Sekretionseffekt ausüben, läßt diese unterschiedliche Metabolisierung von Androgenen in männlichen und Östradiol im weiblichen Tieren folgenden Schluß zu: Wenn - wie wahrscheinlich ist - Bindungen der Hormone an bestimmte Proteine in den Zellen der Erfolgsorgane Voraussetzung für das Einsetzen der physiologisch-chemischen Wirkungen sind, dann müßte die entscheidenden Folgereaktionen relativ schnell

nach Zustandekommen der Protein-Hormon-Bindungen einsetzen, denn das Testosteron wird in den akzessorischen Sexualorganen der männlichen Tiere relativ schnell zu androgenunwirksamen Steroiden metabolisiert [das Gleiche gilt übrigens auch für das androgenwirkende Androstendion (8,10)], während Östradiol nach Aufnahme in Uterus und Vagina bzw. Bindungen an Proteine in diesen Organen nur langsam verändert wird. Andererseits lassen sich bei beiden Hormonen schon etwa eine halbe Stunde nach Applikation Einwirkungen auf den RNA-Stoffwechsel beobachten (11,12). Es ist also möglich, daß die Kumulation von Östradiol in Uterus und Vagina mehrere Stunden nach Applikation keine wesentliche physiologische Bedeutung mehr hat, ja vielleicht sogar die Wirkungen von später hinzukommenden Östradiol beeinträchtigt. Diese Vorstellung würde auch den Widerspruch belanglos machen, daß wohl Östradiol, nicht aber die anderen Oestrogene von Uterus und Vagina bevorzugt gebunden werden. Es würde auch bei diesen anderen Oestrogenen eine kurze, vielleicht nur flüchtige Bindung an spezifische Protein-Rezeptoren genügen.

Im übrigen haben Versuche gezeigt, daß es außer Anreicherungen in bestimmten Organen als Ganzes durchaus auch Anreicherungen in bestimmten Organteilen bzw. Zellorganellen gibt (4,13). Solche mikroskopischen Anreicherungen, denen keine Anreicherungen im Organ als Ganzes zu entsprechen braucht, verdienen das gleiche physiologische Interesse wie Organanreicherungen.

In Differenzierung zu den Angaben über die Metabolisierung von Testosteron im vorigen Abschnitt, sei noch folgendes ausgeführt: Die initialen Metabolit-Spektren, denen man nach Injektion von Testosteron in der Ratte begegnet, unterscheiden sich von Organ zu Organ zum Teil erheblich. In den Vesicular-Drüsen und in der Prostata tritt vor allem 5 α -Dihydrotestosteron auf, das androgen sehr

wirksam ist, während in den meisten anderen Organen Androsteron und Androstendion vorherrschen (8,14). Sehr unterschiedlich ist auch das Ausmaß von Hydroxylierungsreaktionen und Konjugierungen. In den akzessorischen Sexualorganen treten relativ wenig Konjugate auf und die Hydroxylierungsreaktionen setzen nur zögernd ein. Die Vorstellung, daß die Organspezifität bei männlichen Tieren eine Folge spezifischer Metabolisierung ist, gewinnt zunehmende Bedeutung (8,13).

Die kurze Übersicht zeigt, daß keineswegs an primären Wirkorten auffallende Bindungen des interessierenden Hormons erwartet werden können. Das gilt vor allem für bestimmte Erfolgsorgane als Ganzes. Dennoch ist es notwendig abzuklären, unter welchen Bedingungen ein appliziertes Hormon selektive Anreicherung in bestimmten Organen bzw. Organellen erfährt.

Da unter allen Umständen an der Konzeption möglichst physiologischer Bedingungen festgehalten werden soll (unter anderem auch unreife anstelle kastrierter Tiere), bieten sich als Varianten zur Abklärung von Anreicherungsbedingungen nur die Dosis des Hormons und die Zeitspanne zwischen Injektion und Sektion an. Allerdings wäre auch an eine Variation der Applikationsart zu denken, insbesondere an einen Vergleich zwischen Injektion und Infusion. In einer früheren Arbeit wurde aber bereits die Erfahrung gemacht, daß die Infusionstechnik zu unkontrollierbaren Akkumulationen des radioaktiven Materials führt(4). Bezüglich der Dosis war es erforderlich, Mengen auszuprobieren, die denen von Östradiol bei weiblichen Tieren entsprechen. Selbstverständlich kam es darauf an, diese, vom Standpunkt des Testosterons aus subphysiologischen Mengen, mit physiologischen zu vergleichen ($1\mu\text{g}$ mit $100\mu\text{g}$). Bezüglich der Zeitspanne zwischen Injektion und Sektion gab es Anhaltspunkte dafür, daß sehr kleine Zeitspannen berück-

sichtigt werden müssen, einmal deswegen, weil die biologische Halbwertszeit für Testosteron bei wenigen Minuten liegt (15), zum anderen darum, weil bei früheren Versuchen (4,10) gelegentlich Anreicherungen in den akzessorischen Sexualorganen sehr kurze Zeit nach Applikation auftraten. Es kommt hinzu, daß mit zunehmender Kenntnis über Wirkungen von Androgenen im Säugetierorganismus sich ein sehr frühzeitiger biochemischer Wirkungseintritt immer deutlicher abzeichnet.

Auf der anderen Seite mußten auch Verteilungsstudien zwei bis drei Stunden nach Applikation durchgeführt werden, um festzustellen, ob die von TVETER (5) beobachtete Anreicherung in den akzessorischen Sexualorganen von erwachsenen kastrierten Ratten auch bei unreifen Tieren auftreten. Zellfraktionierung in Kerne und Cytoplasma war von Interesse - speziell auch nach Applikation von subphysiologischen Dosen - im Hinblick auf die Befunde von JENSEN (9), STUMPF und ROTH (7) über eine Anreicherung von Östradiol in den Kernen des Uterus-Endometriums.

Experimenteller Teil

A. Methode

1. Tiere und Injektionen

Es wurden für die Versuche 30 Tage alte männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Tieren waren nach vorherigem Auswiegen in Klassen gleicher Körpergewichte eingeteilt worden, um zu große Gewichtsunterschiede in den einzelnen Versuchsreihen zu vermeiden. Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Aktivitätsverteilungen sind mehrere Versuchsreihen durchgeführt worden.

Jeder Wert ist Mittelwert von mindestens drei Tierversuchen.

Die Injektionslösungen sind an jedem Versuchstag frisch hergestellt worden. Hierzu wurde eine entsprechende Menge Testosteron-4-¹⁴C in Benzollösung mit 1 μ Ci/ml Benzol (29,2 mCi/mMol, Molgewicht 288) im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde mit Propylenglykol im 50° C Wasserbad aufgenommen (meist 1 μ Ci [10 μ g], 120 μ Ci [120 μ g] in 1 ml Propylenglykol).

Dazu wurde die gleiche Menge Aqua dest. getan. Bei subphysiologischen Dosen befanden sich in der Regel 0,1 μ Ci [1 μ g] Testosteron in 0,2 ml Propylenglykol/H₂O 1:1, bei physiologischen Dosen 6 μ Ci [60 μ g] Testosteron in 0,2 ml Propylenglykol/H₂O 1:1. Die angegebenen Testosteronlösungen wurden immer subcutan in Richtung des Tierkopfes unter die Bauchhaut injiziert.

2. Aufarbeitung der Tiere

Nach Ablauf der Applikationszeit wurden die Tiere in Äthernarkose dekapitiert und das aus den Halsschlagadern herausfließende Blut sofort in kleine trockene Gefäße aufgefangen. Anschließend wurden folgende Organe herausgenommen:

Vesicular-Drüsen, Hoden, Prostata und Leber.

Bei den Fraktionierungsversuchen wurde auf das Auf-
fangen des Blutes verzichtet und als erste Organe die
Vesicular-Drüsen herausgenommen. Die Drüsen mehrerer Tiere
wurden auf einen Objekthalter zum Gefriermikrotom (Fa.
WKF/Brandau) in etwas Aqua dest. bei -75°C auf Trocken-
eis eingefroren. Das aufgefangene Blut wurde über P_2O_5
im Vakuumexsikator getrocknet und vor der Verbrennung im
Achatmörser gemörsert, damit eine homogene Aktivitätsver-
teilung erreicht wurde. Vesicular-Drüsen und Prostata wur-
den als ganze Organe verwendet, von Leber und Hoden wurden
dagegen etwa nur 50 mg große Stücke entnommen. Organe und
Organstückchen wurden im häufig gewechselten Waschwasser
gewaschen, mit Filterpapier abgetrocknet und ebenfalls
über P_2O_5 im Vakuumexsikator getrocknet. Es wurde dafür
Sorge getragen, daß das P_2O_5 immer im getrocknetem Zu-
stand vorlag, damit die Feuchtigkeit schnell aus den
Organen eliminiert wurde, um so einer Fäulnis vorzubeugen.

3. Zellfraktionierung der Vesicular-Drüsen

Zur Erfassung der ^{14}C -Aktivitäten in den Zellkernen
und im Cytoplasma der Vesicular-Drüsen wurden diese mit
der präparativen Ultrazentrifuge (Fa. WKF/ Brandau) frak-
tioniert. Hierzu diente eine Arbeitsvorschrift nach ALLFREY
(16). Danach wurden die in Wasser eingefrorenen Organe bei
 -18°C im oben erwähnten Kryotom quantitativ in 10 „
große Schnitte zerlegt. Hierzu diente eine selbst ent-
wickelte Einrichtung, bei der das Gut kontinuierlich mit
Motorantrieb geschnitten wurde. Anschließend wurden die
Schnitte in isotonischer Rohrzuckerlösung (0,25 m-Rohr-
zucker und 0,0033 m CaCl_2) im Potter-Elvehjem-Homogenisa-
tor homogenisiert. Es genügte ein kurzes und mäßiges (etwa
1 min. bei 1000 Upm) Homogenisieren, da durch das Schneiden
schon ein weitgehender Aufschluß des Gewebes erreicht wor-
den war. Das Homogenisat wurde dann durch einen mit iso-
tonischer Rohrzuckerlösung angefeuchteten, feinporigen

Perlon-Molton-Filter mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen gesaugt. Das Röhrchen befand sich während des ganzen Filtriervorganges im Eisbad. Mit etwa 2 ml der isotonischen Rohrzuckerlösung wurde nachgewaschen, um das Homogenisat von Bindegewebsresten zu befreien. Die auf diese Weise gewonnenen Zelltrümmer wurden mit Hilfe einer präparativen Ultrazentrifuge (Fa. WKF/Brandau) in Kerne und Cytoplasma getrennt. Die Kerne wurden mit 3700 Upm (ca. 1000 g) bei einer Laufzeit von 7 Minuten abgetrennt. Der Überstand, der das Cytoplasma in der oben erwähnten Rohrzuckerlösung enthielt, wurde sehr vorsichtig über einen Glasstab in eine Kristallisierschale (mit 3 cm Durchmesser) abgegossen. Die Größe der Kristallisierschale wurde so gewählt, daß die Flüssigkeitsschicht etwa einen Zentimeter betrug (geeignete Höhe für die Gefriertrocknung). Nach Waschen der Kerne in 2 ml 0,15 M KCl-Lösung mit anschließender Zentrifugierung bei 4000 Upm für 10 min. wurden auch diese über P_2O_5 im Vakuumexsikator getrocknet. Die Radioaktivität der Waschflüssigkeit wurde jedesmal überprüft, um beurteilen zu können, mit welchen Aktivitätsverlusten im Kernmaterial gerechnet werden muß. Die rohrzuckerhaltige Cytoplasma-lösung wurde bei $-40^{\circ}C$ unter kontinuierlichem Heizen des Gutes in einer Gefriertrocknungsanlage (Fa. WKF/Brandau) getrocknet. Bei einer Schichthöhe von 1 cm dauerte die Gefriertrocknung etwa 24 Stunden. Nach Beendigung wurde auch das Cytoplasma-Rohrzucker-Gemisch im Vakuumexsikator über P_2O_5 trockengehalten.

4. Bestimmung des Proteingehaltes der Cytoplasmafraktion
(Biuret-Reaktion)

Der Proteinanteil der Cytoplasmafraktion wurde mit Hilfe einer speziellen Biuret-Reaktion bestimmt (17). Bei den ^{14}C -Aktivitätsbestimmungen (vergleiche Abschnitt 6) wird die Zerfallsrate auf die Gesamtmenge organischer

Substanz, die in der Probe enthalten ist bezogen(dpm/mg). Diese enthält neben dem Cytoplasma erhebliche Mengen von Rohrzucker, der bei der Fraktionierung zugesetzt wurde (vergleiche Abschnitt 3) . Für die Auswertung ist es jedoch erforderlich den Anteil des Cytoplasmas an der organischen Substanz zu erfassen. Dieses ist mit Hilfe der schon oben erwähnten Biuret-Reaktion möglich. Diese Methode beruht im Prinzip darauf, daß die Peptidbindungen der Cytoplasmaweiße mit dem Biuret-Reagenz einen rot-violetten Farbkomplex bilden, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen wird. Hierbei handelt es sich um einen Chelat-Komplex, den die Kupferionen mit den Peptidbindungen bilden. Ein Umrechnungsfaktor erlaubt die Bestimmung der Proteinmenge aus den Extinktionswerten. Da der Hauptanteil des Cytoplasmas nach Entfernung des Wassers aus Protein besteht, kann der Fehler, der dadurch entsteht, daß man die Radioaktivität auf den Kohlenstoff des Eiweißanteiles und nicht auf den Kohlenstoffgehalt des gesamten Cytoplasmas bezieht, vernachlässigt werden. Bei allen unseren Analysen mit Organproteinen zeigte es sich, daß ihr Kohlenstoffgehalt etwa 50 Prozent beträgt.

Um die Gesamtkohlenstoffmenge des Eiweißes zu erfassen, mußte die gesamte Menge des Rohrzucker-Cytoplasma-Gemisches ausgewogen werden. Es wurde dabei so vorgegangen, daß zuerst das Gewicht von Kristallisierschale und gefriergetrocknetem Gut bestimmt wurde. Dann wurde nach Mörsern im Achatmörser und Auswaage von etwa 2 x 100 mg für die Biuret-Reaktion die Kristallisierschale ausgespült, gereinigt, getrocknet und das Leergewicht bei Zimmertemperatur bestimmt. Aus der Differenz von Leergewicht und Gewicht der Kristallisierschale mit Gut unter Berücksichtigung der entnommenen 200 mg für die Biuret-Reaktion erhielten wir das Gesamtgewicht des Rohrzucker-Cytoplasma-Gemisches. Die Biuret-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

- (1) Zu jeder Probe mit etwa 100 mg Gut wurden 1 ccm Aqua dest. und 0,15 ml einer 3 m-Trichloressigsäure gegeben. Nach mehrmaligem Umrühren mit einem Glasstab wurden alle Proben 5 min. stehengelassen.
- (2) Bei ca. 6000 Upm wurden alle Röhrchen anschließend 10 min lang in einer Laborzentrifuge (Fa. Christ) zentrifugiert.
- (3) Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes und anschließendem Abtropfen auf Filterpapier wurde jede Probe mit 5 ml Aqua dest. aufgeschlemmt. Dazu wurden dann 5 ml Biuret-Reagenz getan, so daß das Gesamtvolumen 10 ml betrug.
Herstellung und Zusammensetzung des Biuret-Reagenz:
400 mg einer 0,2 n NaOH werden mit Kaliumnatriumtartrat (Seignette-Salz) versetzt, dazu kommen 3,0 g frisch gepulvertes CuSO_4 . Nach Auflösen des CuSO_4 werden 5,0 g KJ hinzugegeben, und die ganze Lösung bis auf 1000 ml mit 0,2 n NaOH aufgefüllt. Man bewahrt das fertige Reagenz am besten in einer braunen Flasche auf.
- (4) Nach einer zwanzigminütigen Wartezeit erfolgte die Vermessung der Farblösung in einem Photometer (Fa. C. Zeiss, Mod. Q III) bei einer Wellenlänge von 546 nm . Als Minuskontrolle diente eine Probe mit 5 ml Biuret-Reagenz und 5 ml Aqua dest.

Der gemessene Extinktionswert wurde mit einem für die Biuret-Reaktion speziellen, konstanten Umrechnungsfaktor (1 cm Küvette, 536 nm, Extinktion 1,00) multipliziert. Das Ergebnis zeigte die in der Probe enthaltene Proteinmenge in Milligramm an. Die Kenntnis der Gewichtsmenge des Rohrzucker-Cytoplasma-Gemisches und die Kenntnis des Eiweißgehaltes einer definierten Menge dieses Gemisches erlauben die Berechnung der gesamten Proteinmenge im Gemisch. Hierzu sei nachstehendes Beispiel gegeben:

Gemessener Extinktionswert der Probe:	0,047
Umrechnungsfaktor:	33 mg

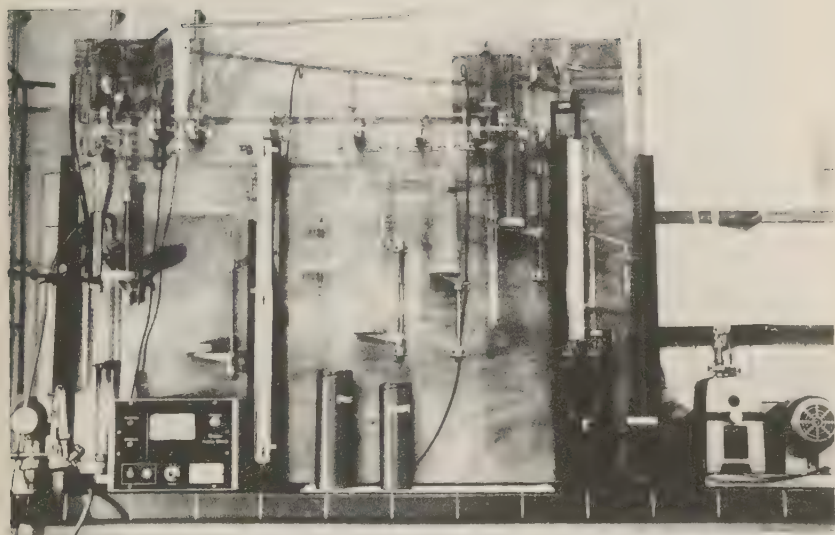


Abb. 1 SIMONSche Apparatur zur Messung von ^{14}C -Aktivitäten
in Gasphase

$0,047 \cdot 33 \text{ mg} = 1,55 \text{ mg Protein in der Probe}$
 Eingewogenes Rohrucker-Cytoplasma-Gemisch für die
 Biuret-Reaktion: 95,61 mg
 Gesamte Rohrucker-Cytoplasma-Gemischmenge: 733,62 mg
 In dem gesamten Rohrucker-Cytoplasma-Gemisch befinden sich
 also: $1,55 \text{ mg} \frac{733,62 \text{ mg}}{95,61 \text{ mg}} = 11,95 \text{ mg Protein}$

Wie oben schon erläutert, konnten wir annehmen, daß der
 Kohlenstoffgehalt der Organproteine, also auch der des
 Vesicular-Drüsen-Zellcytoplasmas, etwa 50 Prozent beträgt.
 Deshalb ergibt die Division der errechneten Proteinmenge
 in dem Rohrucker-Cytoplasma-Gemisch durch Zwei die ge-
 suchte Kohlenstoffmenge des gesamten Rohrucker-Cytoplasma-
Gemisches: $11,95 \text{ mg} : 2 = 5,98 \text{ mg Kohlenstoff}$.

5. Radioaktivitätsbestimmungen

a) Messung der ^{14}C -Aktivität in Gasphase

Zur Radioaktivitätsbestimmung aller seziierten Organe
 und der fraktionierten Vesicular-Drüsen wurden diese oxy-
 dativ vergast. Etwa 1 bis 10 mg der völlig trockenen Or-
 gane, Zellkerne und Cytoplasma-Rohrzuckerlösung wurden zu-
 sammen mit 50 mg CuO und 80 mg KClO_4 in einem Spezialbom-
 benrohr aus Supremax-Glas (Fa. A. Rummel, Augsburg; Durch-
 messer der Bombenrohre 0,9 cm, Länge 24 cm) unter Vakuum
 verschlossen und bei 640°C 60 min. verbrannt. Bei der Ver-
 brennung entsteht neben Wasserdampf und Nitrosegasen auch
 $^{14}\text{CO}_2$ -haltiges Kohlendioxyd. Der weitere Arbeitsgang an der
 von SIMON entwickelten Apparatur (18) zur Messung von ^{14}C -
 Aktivitäten in der Gasphase gliederte sich in drei Abschnit-
 te (siehe hierzu Abb. 1 und 3):

(1) Initiale Phase ist nach Evakuierung der Apparatur die
 Zertrümmerung des Bombenrohres mit anschließender Ein-
 frierung des gasförmigen Kohlendioxyds in einer durch flüs-
 sigen Stickstoff gekühlten Kühlfalle. Gleichzeitig wird das
 Wasser in einer durch eine Trockeneis-Alkoholmischung ge-



Abb. 2 Gasfüllzählrohr, Antikoinzidenzschirmzählrohr, Bleiziegel und 3-Kanal-Antikoinzidenzmessverstärker

kühlten Falle bei -70°C eingefroren. Alle übrigen noch nicht eingefrorenen Restgase werden durch erneute Evakuierung der Apparatur abgesaugt.

(2) Überführung des nach Auftauen der Kühlfalle freigewordenen Kohlendioxyds in den Manometerteil der SIMON-schen Apparatur mit Hilfe einer weiteren durch flüssigen Stickstoff gekühlten Kühlfalle. Nach Abtrennung des Manometerteils von der übrigen Apparatur wird die Kühlfalle aufgetaut. Das CO_2 wird nun volumetrisch bei Raumtemperatur gemessen (siehe auch Abb. 4).

(3) Anschließend wird das Kohlendioxyd in den letzten Abschnitt der Apparatur übergeleitet und durch Methan in das vorher evakuierte Gasfüllzählrohr unter 1 atm Druck überführt.

Die mit radioaktivem CO_2 gefüllten Zählrohre wurden mindestens 30 min. liegengelassen, bevor das $^{14}\text{CO}_2$ -haltige Gas in Proportionalzählung bestimmt wurde, um so eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Kohlendioxyds im Methan zu erreichen.

Da es auf die Bestimmung sehr kleiner Radioaktivitätsmengen ankam, war es erforderlich den Untergrund (background), der normalerweise 100 bis 200 cpm beträgt, möglichst stark herabzusetzen. Wir bedienten uns hierzu eines Antikoinzidenz-Schirmzählrohres mit einem 3-Kanal-Antikoinzidenz-Verstärker (Fa. Friesseke/Hoepfner). Das Prinzip dieser Antikoinzidenzmessung ist folgendes: Die energiereichen Beta-Teilchen im Gasfüllzählrohr gelangen nicht in das umgebende doppelzylindrische Schirmzählrohr. Andererseits müssen die energiereichen Teilchen der Höhenstrahlung, die den Hauptanteil des backgrounds bedingen, notwendigerweise ihren Weg durch das umgebende Schirmzählrohr nehmen. Sie führen damit gleichzeitig zu Entladungen im Schirmzählrohr und Gasfüllzählrohr. Der Antikoinzidenzmessverstärker ermöglicht die Unterdrückung solcher gleich-

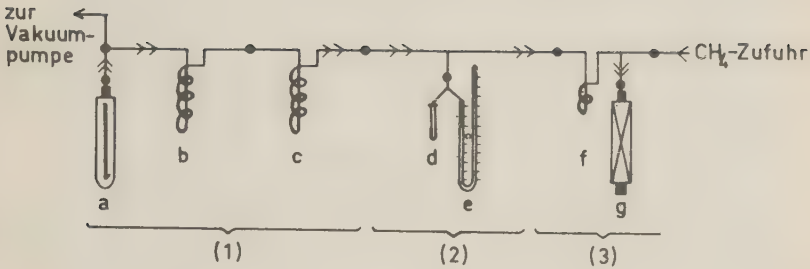


Abb. 3 Schematische Skizze der SIMONSchen Apparatur zur Messung des $^{14}\text{CO}_2$ in Gasphase

Zeichenerklärung: ● Ventil ➞ Richtung des Gasstromes

- a. Bombenrohr im Zertrümmerer
- b. Kühlfalle für H_2O (Trockeneis-Alkohol-Mischung)
- c. Kühlfalle für CO_2 (Flüssiger Stickstoff)
- d. Kühlfinger für CO_2
- e. Manometer (siehe Abb. 4)
- f. Kühlfalle für CO_2
- g. Gasfüllzählrohr

Die in Klammern stehenden Zahlen beziehen sich auf den Text im Abschnitt 5a.

zeitigen Entladungen im Schirmzählrohr und Gasfüllzählrohr. Die ganze Zählrohranordnung wurde in Bleiziegel eingehüllt, wodurch eine weitere Herabsetzung der einfallenden Höhenstrahlung erreicht wurde. Durch diese doppelte Abschirmvorrichtung, gelang es uns, den Untergrund auf 2 bis 4 cpm herabzusetzen. Die Arbeitsspannung der Gasfüllzählrohre betrug in der Regel 3600 Volt, die Spannung des Schirmzählrohres 1200 Volt. Registriert wurden Spannungsabfälle von mehr als 1 mV.

b) Flüssig-Szintillator-Technik

Zur Kontrolle des ^{14}C -Verlustes nach dem Waschen der Vesicular-Drüsen-Zellkerne bei den Fraktionierungsversuchen wurden 0,5 ml der gesammelten Waschflüssigkeit in 10 ml einer hydrophilen Szintillatorlösung gebracht. Die Zusammensetzung der Szintillatorlösung ergibt sich aus nachstehender Übersicht:

Lösung A: 4,0 g PPO¹⁾ + 0,015 g POPOP²⁾ in 1 l Toluol

Lösung B: 600 ml der Lösung A + 400 ml absoluten Alkohol

Lösung C: 9 Teile der Lösung B + 1 Teil Äthanolamin

Die Lösung C wurde vor jeder Messung frisch angesetzt.

Von 10 ml dieser hydrophilen Szintillatorlösung können

0,5 ml einer wässrigen Lösung aufgenommen werden. Die in

der Waschflüssigkeit enthaltene Radioaktivität wurde im

Flüssigszintillationsspektrometer (Tricarbcounter der

Fa. Packard, Mod. 3002) bestimmt. Zur Korrektur des Löscheffektes (quench) diente die Zugabe von 1 ml ^{14}C -Benzoe-

säure in Toluol als innerer Standard zu 10 ml Szintilla-

tionslösung und 0,5 ml Waschflüssigkeit. 1 ml dieses inneren

Standards hatte eine Zerfallsrate von 1000 dpm.

¹⁾ PPO = 2,5-Diphenyl-oxazol

²⁾ POPOP = 2,2-p-Phenylene-bis(4-methyl-5-phenyl)-oxazol

6. Auswertung

Zur Vereinheitlichung der Analysenauswertung wurden alle Meßergebnisse in ein vorgedrucktes Formblatt eingetragen, auf dem auch gleichzeitig die Berechnungen durchgeführt wurden.

Als Meßgrößen lagen vor:

- (1) Trockengewicht der Organe (in mg)

Die Auswaage erfolgte auf einer Metler-Analysenwaage.

- (2) Druck des CO₂-Gases im Manometer der SIMON-schen Apparatur (in cm Hg) .

Es wurde der Abstand der beiden Quecksilber-Menisken abgelesen.

- (3) Volumen V_v (variables Volumen) zwischen Nullmarke des Manometers und dem linken Meniskus (siehe hierzu Abb. 4). Für dieses Volumen gilt:

$$V_v = q \cdot l$$

wobei q = Querschnitt der Manometer-Kapillaren (0,0855 cm²) und l = Länge zwischen Nullmarke des Manometers und dem linken Quecksilber-Meniskus bedeuten.

- (4) Temperatur am Manometer (in °C).

- (5) Impulsraten (in cpm) , die am oben erwähnten Meßplatz (Gasfüllzählrohr, Antikoinzidenzschirmzählrohr, Zählgeräte und Bleiabschirmung) angezeigt wurden. Die Werte wurden nicht nur bei einer Arbeitsspannung (im Mittel 3600 Volt), sondern auch bei einigen kleineren und größeren Spannungen gemessen, um sicher zu gehen, daß zum Zeitpunkt der Messung ein Plateau vorhanden war. Es zeigt sich nämlich immer wieder, daß es wegen Störeintrüchen aus dem örtlichen Stromnetz und Hochspannungsüberschlägen in den Vorverstärkern leicht zu Störimpulsen kommt, die die Ausbildung eines Zählrohr-Plateaus verhindern.

Außer diesen Meßgrößen bei den Einzelanalysen waren noch einige andere Daten für die Auswertung erforderlich:

- (6) Gasvolumen V_k (konstantes Volumen) im Manometer der SIMON-schen Apparatur (siehe Abb. 4) oberhalb der Nullmarke (in ccm).

V_k wurde mit Hilfe zweier Methoden bestimmt:

- a) Der Manometerraum oberhalb der Nullmarke wurde einschließlich der angrenzenden Kühlfalle mit Quecksilber aufgefüllt. Das Gewicht des eingefüllten Quecksilbers wurde durch Differenzbildung (Gewicht eines Hg-Vorrates vor und nach Füllung) ermittelt. Nach der Beziehung :

$$\text{spez. Gewicht} = \frac{\text{Gewicht}}{\text{Volumen}}$$

konnte das Volumen V_k errechnet werden. Z.B. :

Ausgewogene Hg-Menge:	150,00 g
Hg-Menge nach Auffüllung von V_k :	34,83 g
Eingefüllte Hg-Menge:	115,17 g

$$V_k = \frac{115,17 \text{ g}}{13,55 \frac{\text{g}}{\text{ccm}}} = 8,5 \text{ ccm}$$

Dieses Verfahren wurde mehrmals hintereinander durchgeführt. Als endgültiger Wert für V_k wurde von allen Ergebnissen das arithmetische Mittel gebildet.

- b) Es wurde eine vorher genau abgewogene Menge Benzoesäure vollständig zu Kohlendioxyd verbrannt und aus Druck und bekannter CO_2 -Menge das Volumen V_k errechnet. Ein Mol (122,00 g) Benzoesäure ergeben bei vollständiger Verbrennung 7 Mol CO_2 .
- (7) Ausbeute des Zählrohres (in Prozent).
- Hierzu wurde eine kleine Menge ^{14}C -Benzoesäure (mit 115 dpm/mg) zu $^{14}\text{CO}_2$ -Gas verbrannt. Nach Überführung des Gases in das Gasfüllzählrohr und Messung der Radioaktivität in der schon beschriebenen Antikoinzidenz-Schirmzählrohr-Meßanordnung (siehe Abschnitt 5), läßt

sich aus dem Verhältnis der Impulse pro Minute (Impulsrate = cpm) zu den Zerfällen pro Minute (Zerfallsrate = dpm), die wegen der Einwaage einer bestimmten Menge des ^{14}C -Standards mit bekannter spezifischer Aktivität feststehen, die prozentuale Ausbeute des Zählrohres bestimmen. Z.B.;

Eingewogene ^{14}C -Benzoesäure-Menge:	5,20 mg
Zu erwartende Aktivität: $115 \text{ dpm} \cdot 5,20 \text{ mg}$	= 598 dpm
Gemessene Aktivität:	500 cpm

Ausbeute des Zählrohres: $\frac{500 \text{ cpm}}{598 \text{ dpm}} \cdot 100 = 83 \%$

Jedes Gasfüllzählrohr wurde nach der Messung längere Zeit evakuiert, um alle Restgase vollständig vor der nächsten Füllung zu entfernen. Neue Gasfüllzählrohre mußten sogar oft tagelang wegen der in dem Abdichtungskitt vorhandenen Gase evakuiert werden. Die Ausgasung aller verwendeten Zählrohre wurde vor jeder Neufüllung an der SIMONschen Apparatur durch Messung des Vakuums überprüft.

Das Prinzip der manometrischen Messung an der SIMONschen Apparatur läßt sich anhand einer einfachen Skizze erläutern (siehe Abb. 4). Nach Auftauen des im Kühlfinger mit flüssigem Stickstoff eingefrorenen Kohlendioxyds und Erreichen der vom Thermometer angezeigten Temperatur am Manometer, füllt das Gas das durch Eichung bekannte Volumen V_k oberhalb der Nullmarke und das Volumen V_v zwischen Nullmarke und linkem Quecksilbermeniskus. Der Druck p im Gasraum ist gleich dem Abstand der beiden Quecksilbermenisken. Nach dem BOYLE - MARIOTTESchen Gesetz gilt allgemein:

$$p \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

Zur Eliminierung der allgemeinen Gaskonstanten R aus der Gleichung kombiniert man mit der entsprechenden Gleichung unter Normalbedingungen (mit $V_0 = 22,41 \text{ l}$, $p_0 = 1 \text{ atm}$ und $T_0 = 273^\circ \text{K}$):

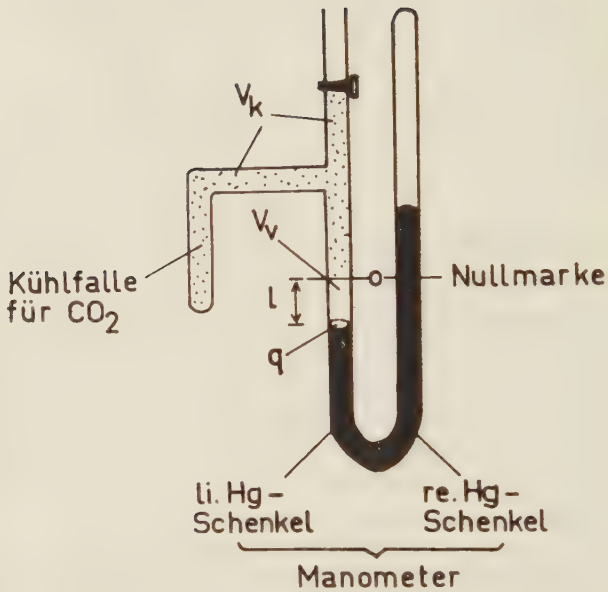


Abb. 4 Skizze des Manometerteils der SIMONSchen Apparatur
Zur Zeichenerklärung siehe Text im Abschnitt 6 (7)

$$R = \frac{p \cdot V}{n \cdot T}$$

$$R = \frac{p_0 \cdot V_0}{T_0}$$

$$\frac{p \cdot V}{n \cdot T} = \frac{p_0 \cdot V_0}{T_0} \rightarrow n = \frac{p \cdot V}{T} \cdot \frac{T_0}{p_0 \cdot V_0}$$

$$n = p \cdot V \cdot \frac{T_0}{p_0 \cdot V_0 \cdot T} \quad \text{oder: } n = p \cdot V \cdot K_t$$

Die temperaturabhängige Konstante $K_t = \frac{T_0}{p_0 \cdot V_0 \cdot T}$

läßt sich aus Tabellen entnehmen.

Wie oben schon erläutert, setzt sich das Volumen V aus dem bekannten Volumen V_k und dem gemessenen Volumen V_v zwischen Nullmarke und linkem Quecksilber-Meniskus (mit q. l) zusammen, es gilt also speziell:

$$n = p \cdot (V_k + [q \cdot l]) \cdot K_t$$

Mit Hilfe dieser Gleichung wurde von allen verbrannten Organproben die Kohlendioxydmenge in Mol und darüberhinaus auch die Kohlenstoffmenge in mg errechnet. Z.B.:

$$V_k = 8,5 \text{ ccm} \quad \text{Temperatur am Manometer: } 25,4^\circ\text{C}$$

$$\text{Korrekturfaktor } K_t (25,4^\circ\text{C}) : 0,5372 \cdot 10^{-6}$$

$$\text{Linker Hg-Schenkel: } 35,0 \text{ cm, Rechter Hg-Schenkel: } 35,3 \text{ cm}$$

$$\text{CO}_2\text{-Druck im Manometer: } 70,3 \text{ cm Hg}$$

$$n = 70,3 \cdot (8,5 + [0,0855 \cdot 35,0]) \cdot 0,5372 \cdot 10^{-6}$$

$$n = 4,34 \cdot 10^{-4} \text{ Mol CO}_2$$

$$n \cdot 12,01 \cdot 10^3 \text{ mg C} = \underline{5,22 \text{ mg Kohlenstoff in der Probe}}$$

Nach Messung der ^{14}C -Aktivität der Probe im Gasfüllzählrohr und Abzug des backgrounds erhält man:

Arbeitsspannung : 3600 Volt

Meßdauer : 10 min.

$$\begin{array}{r}
 45,5 \text{ cpm} \\
 - 4,0 \text{ cpm background} \\
 \hline
 41,5 \text{ cpm (Impulsrate in der Probe)} \\
 \\
 \frac{41,5 \text{ cpm}}{5,22 \text{ mg C}} = 7,96 \text{ cpm/mg C}
 \end{array}$$

Bei diesem Ergebnis muß noch die Ausbeute des Zählrohres berücksichtigt werden. Bei einer 85-prozentigen Ausbeute z.B. würde der endgültige Wert heißen:

$$\frac{7,96}{85} \cdot 100 = 9,36 \text{ dpm/mg C (Aktivität der Probe)}$$

- (8) Bei der Zellfraktionierung mußte für das Cytoplasma der Vesicular-Drüsen eine weitere Berechnung durchgeführt werden, da hier die bei der Fraktionierung verwendete isotonische Rohrzuckerlösung den gemessenen Aktivitätswert in dpm/ mg C verfälscht. Wie schon in Abschnitt 4 ausgeführt wurde, erlaubt die Kenntnis der Gesamtmenge von Rohrzuckerlösung und Cytoplasma die Umrechnung vom Kohlenstoffgehalt der in der Einzelprobe enthaltenen Proteinmenge auf den Kohlenstoffgehalt der gesamten durch Rohrzucker verunreinigten Eiweißmenge. So ist es möglich, von der Zerfallsrate einer Probe auf die Gesamtprobe umzurechnen.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität dpm/mg C der Proteine in der Cytoplasmafraktion sei am nachfolgenden Beispiel erläutert:

Bei einem Molgewicht von 342,31 g Rohrzucker und der Summenformel $C_{12}H_{22}O_{11}$ (= $[C_6H_{12}O_6]_2 - H_2O$) ergibt sich für die verwendete Rohrzuckerlösung ein Kohlenstoffanteil von $\frac{144}{342,31} = 0,42$, wobei 144 der Gewichtsanteil aller Kohlenstoffatome des Rohrzuckers ist. Multipliziert man nun die für die Aktivitätsbestimmung eingewogene Menge Rohrzucker-Cytoplasma-Gemisch mit 0,42 ,

so erhält man die gesuchte Kohlenstoffmenge in dem gefriergetrockneten Gut. Z.B. :

$$7,55 \cdot 0,42 = \underline{3,17 \text{ mg Kohlenstoff in der eingewogenen}} \\ \underline{\text{Rohrzucker-Cytoplasma-Gemisch-Probe}}$$

Die gemäß Abschnitt 5 gewonnenen Aktivitätswerte liegen infolge des Rohrzuckers etwas zu hoch. Bei unserer empfindlichen Meßanordnung macht sich bereits die natürliche Radioaktivität des Kohlenstoffs bemerkbar. Es mußte daher der ^{14}C -Gehalt einer definierten Menge Rohrzucker bestimmt werden, um die in der Probe gemessene Aktivität korrigieren zu können. Z.B. :

Eigenaktivität des verwendeten Rohrzuckers: 0,413 dpm/mgC
Kohlenstoffanteil der eingesetzten Rohrzucker-Cytoplasma-Gemisch-Probe : 3,17 mg

Der natürliche ^{14}C -Gehalt beträgt also:

$$0,413 \text{ dpm/mg C} \cdot 3,17 \text{ mg C} = \underline{1,30 \text{ dpm}}$$

Durch Subtraktion dieses Wertes von der gemessenen Probenaktivität erhält man die Radioaktivität des in der Gemischprobe vorhandenen Vesicular-Drüsen-Zellcytoplasma. Z.B. :

Aktivität des Rohrzucker-Cytoplasma-Gemisches (Probe) :
5,0 dpm

Natürliche Aktivität des in der Probe vorhandenen Rohrzuckers : 1,3 dpm

$$5 \text{ dpm} - 1,3 \text{ dpm} = \underline{3,7 \text{ dpm Aktivität des Cytoplasma ohne}} \\ \underline{\text{Rohrzucker.}}$$

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des Cytoplasma, ausgedrückt in dpm/mg Kohlenstoff, errechnet man aus dem bereits bekannten Proteingehalt des Rohrzucker-Cytoplasma-Gemisches die dpm/mg Protein und durch Multiplikation mit Zwei die dpm/mg Kohlenstoff. Z.B. :

$$11,95 \text{ mg (Gesamtproteingehalt).} \quad \frac{7,55 \text{ mg (Probenmenge)}}{733,62 \text{ mg (Gesamtmenge)}}$$

$$= 0,123 \text{ mg Protein}$$

$$\frac{\text{dpm}}{\text{mg Protein}} = \frac{3,7 \text{ dpm (Radioaktivität der Probe)}}{0,123 \text{ mg (Proteinmenge der Probe)}}$$

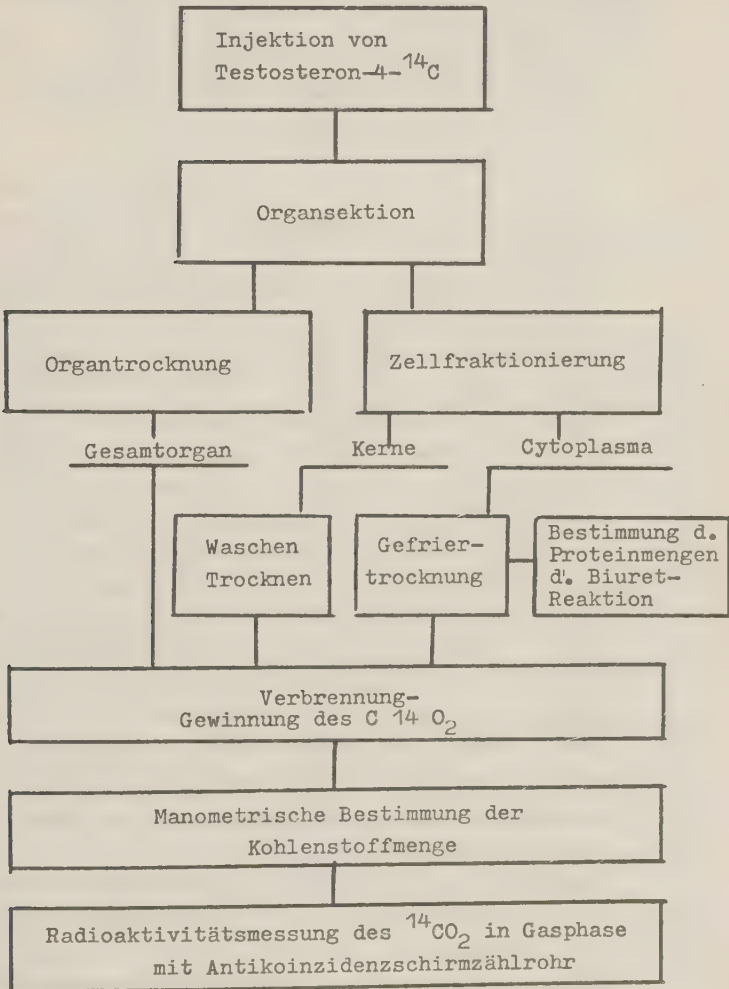
$$= 30,1 \text{ dpm/ mg Protein}$$

$$\frac{\text{dpm}}{\text{mg C}} = 30,1 \text{ dpm/mg Prot.} \cdot 2 = 60,2 \text{ dpm/mg C}$$

Gesamtaktivität der Cytoplasmafraktion:

$$60,2 \text{ dpm/mg C} \cdot 5,98 \text{ mg C (Gesamtkohlenstoffgehalt)}^{+)} \\ = \underline{360 \text{ dpm}}$$

⁺) siehe S. 16

Übersicht über die einzelnen Arbeitsgänge

B. Ergebnisse

1. Zeitlicher Verlauf der Radioaktivitätsverteilung ohne Organfraktionierung

a) Bei subphysiologischen Dosen von $0,1 \mu\text{Ci}$ ($1 \mu\text{g}$) Testosteron-4- ^{14}C fanden wir zu verschiedenen Zeiten zwischen Applikation und Sektion die in Tab. 1 aufgeführten Werte.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die spezifischen Aktivitäten drei Minuten nach Injektion wesentlich stärker variieren als neunzig und einhundertachtzig Minuten nach Injektion. Die Verteilung des noch unveränderten Testosterons kann nur durch die initialen Aktivitätswerte erfaßt werden, da bereits nach 15 min. große Mengen an Metaboliten vorliegen. Nach PEARLMAN (15) liegt die biologische Halbwertszeit des Testosterons bei etwa 4 min. Der relative Aktivitätsabfall ist am größten bei der Leber und am kleinsten beim Blut (Verhältnis zwischen Anfangs- und Endwerten). 180 min. nach Injektion zeigen Hoden, Blut und Prostata noch etwa 10 Prozent, die Leber 5 Prozent und die Vesicular-Drüsen nur noch 3,5 Prozent ihrer Ausgangsaktivität. Von besonderem Interesse ist das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten aller Organe gegenüber der des Blutes. Wenn diese spezifischen Aktivitäten höher liegen als im Blut, muß aus irgendeinem Grund eine Anreicherung auf Kosten des transportierenden Blutes aufgetreten sein. In den Sexualorganen liegt eine erwähnenswerte Anreicherung gegenüber Blut nur 3 min. nach Injektion vor. Dieses spielt bei den beiden akzessorischen Sexualorganen Prostata und Vesicular-Drüsen eine wesentlich größere Rolle als beim Hoden, der Hauptproduktionsstätte der Androgene. Unter den beiden akzessorischen Sexualorganen selbst wird die Prostata bevorzugt. Vergleicht man die spezifischen Aktivitäten der einzelnen

Tab. 1 Spezifische Aktivitäten (dpm/mg Kohlenstoff)
in verschiedenen Organen von 30 Tage alten
Sprague-Dawley-Ratten 3,15,90,180 Minuten
nach subcutaner Injektion von $0,1 \mu\text{Ci}$ ($1 \mu\text{g}$)
Testosteron-4- ^{14}C in 0,2 ml Propylenglykol/ H_2O
1:1 . Arithmetische Mittel von 3,6 oder 9
Tieren mit Angabe der mittleren Fehler.

O r g a n	Minuten(Tierzahl)			
	3 (9)	15 (6)	90 (3)	180 (6)
Blut	$21,4 \pm 2,9$	$23,3 \pm 3,1$	$9,8 \pm 2,9$	$3,6 \pm 0,4$
Hoden	$35,6 \pm 4,9$	$16,7 \pm 3,4$	$9,1 \pm 0,6$	$6,2 \pm 1$
Ves.Drüsen	$69,2 \pm 1,8$	$39,7 \pm 4,3$	$15,7 \pm 3,6$	$10,6 \pm 1,5$
Prostata	$89,9 \pm 9,7$	$27,1 \pm 4,5$	$10,2 \pm 0,8$	$10,2 \pm 2,2$
Leber	$287,2 \pm 14,1$	$189,3 \pm 27,8$	$53,3 \pm 7,2$	$39,7 \pm 4,6$



Abb. 5 Spezifische Aktivitäten (dpm/mg Kohlenstoff) in Leber, Prostata, Vesicular-Drüsen, Hoden und Blut zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Injektion von $0,1 \mu\text{Ci}$ ($1 \mu\text{g}$) Testosteron-4- ^{14}C in 30 Tage alte Sprague-Dawley-Ratten; die Pfeile stellen die mittleren Fehler dar (siehe auch Tab. 1).

Tab. 2 Verhältnis der spezifischen Aktivitäten in einigen Organen 30 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten gegenüber Blut (1,00) zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Injektion von $0,1 \mu\text{Ci}$ ($1 \mu\text{g}$) Testosteron-4- ^{14}C in $0,2 \text{ ml}$ Propylenglykol/ H_2O 1:1. Hierzu siehe auch Tab. 1.

O r g a n	Minuten (Tierzahl)			
	3 (9)	15 (6)	50 (3)	180 (6)
Hoden	1,70	0,74	0,90	1,50
Ves.Drüsen	3,50	1,74	1,50	2,50
Prostata	4,70	1,08	1,00	4,00
Leber	13,80	7,50	5,30	8,50

Organe mit der des Blutes zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion, so findet man die in Tab. 2 aufgeführten Abweichungen in Prozent.

b) Neben subphysiologischen Dosen von Testosteron-4-¹⁴C wurden von uns auch physiologische Dosierungen (6 und 10 μ Ci) verwendet. Hierbei kam es uns darauf an, nachzuprüfen, ob 15 min. nach Applikation auch bei höheren Testosteron-Dosen eine Radioaktivitätsanreicherung in den beiden akzessorischen Sexualorganen gegenüber Blut beobachtet wird, wie sie bei subphysiologischen Testosterongaben, die physiologischen Östradiol-Dosen entsprechen würden, nachweisbar ist. Wie im theoretischen Teil ausgeführt wurde, haben wir es nämlich vor Beginn dieser Arbeiten grundsätzlich für möglich gehalten, daß bei Einsatz subphysiologischer Testosteron-Dosen eher eine Anreicherung in den Sexualorganen erreicht wird als mit physiologischen Hormongaben, entsprechend den Erkenntnissen bei Einsatz von Östradiol im weiblichen Organismus (9). Tab. 3 aber zeigt, daß wir den erwarteten Unterschied nicht haben beobachten können. Auch nach Einsatz physiologischer Dosen von Testosteron-4-¹⁴C gibt es in den akzessorischen Sexualorganen eine Anreicherung gegenüber Blut, die der Anreicherung bei subphysiologischen Dosen dieses Hormons nicht nachsteht.

Auf eine Untersuchung anderer Organe mit physiologischen Testosteron-Dosen haben wir wegen der Ähnlichkeit der Ergebnisse, die mit subphysiologischen Hormongaben erzielt wurden, verzichtet.

2. Radioaktivitätsverteilung auf die Zellfraktionen von Vesicular-Drüsen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation

Zur Klärung der Frage nach der Anreicherung von Testosteron-4-¹⁴C in den Zellfraktionen der Vesicular-Drüsen unreifer Ratten wurden ein sehr kleiner (3 min.) und

Tab. 3 Spezifische Aktivitäten (dpm/mg·Kohlenstoff) in Blut, Leber und Vesicular-Drüsen von 30 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten 3 und 15 Minuten nach subcutaner Injektion von $6\mu\text{Ci}$ ($60\mu\text{g}$) Testosteron-4- ^{14}C in 0,2 ml Propylen-glykol/ H_2O 1:1. Arithmetische Mittel von 18 Tieren mit Angabe der mittleren Fehler.

O r g a n	Minuten (Tierzahl)	
	3 (9)	15 (9)
Blut	689 ± 24	1351 ± 35
Ves.-Drüsen	1056 ± 48	1350 ± 48
Leber	9911 ± 123	9325 ± 30

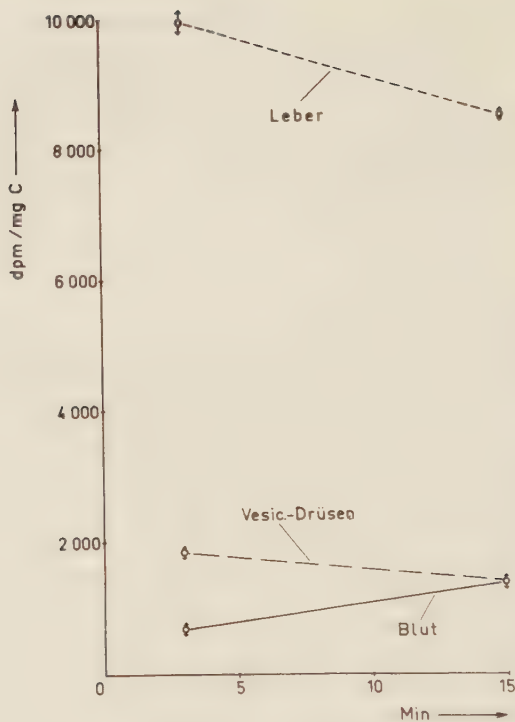


Abb. 6 Spezifische Aktivitäten (dpm/mg Kohlenstoff) in Leber, Vesicular-Drüsen und Blut 3 und 15 Minuten nach subcutaner Injektion von $6 \mu\text{Ci}$ ($60 \mu\text{g}$) Testosteron-4- ^{14}C in 30 Tage alte Sprague-Dawley-Ratten. Jeder Punkt entspricht 9 Tieren; die Pfeile stellen die mittleren Fehler dar (siehe auch Tab.3).

ein sehr großer (180 min.) Zeitabstand zwischen Applikation und Sektion gewählt. Zum Einsatz kamen wiederum $0,1 \mu\text{Ci}$ ($1 \mu\text{g}$) des markierten Hormons.

a) 3 Minuten nach Injektion des radioaktiven Testosterons zeigte es sich, daß die durchschnittliche spezifische Aktivität im Cytoplasma der Vesicular-Drüsen mit 121 dpm/mg Kohlenstoff um das 1,5-fache höher liegt als in den Zellkernen mit 70 dpm/mg Kohlenstoff. Betrachtet man die prozentualen Anteile der Zellfraktionen an der Gesamtaktivität der Vesicular-Drüsen, so tritt eine noch stärkere Bevorzugung der Cytoplasmafraktion in Erscheinung:

Gesamtaktivität der Vesicular-Drüsen:	961 dpm
Aktivität der Zellkerne:	140 dpm
Aktivität des Cytoplasmas:	821 dpm

$$\frac{140 \text{ dpm}}{961 \text{ dpm}} \cdot 100 = 14,6 \% \text{ der Radioaktivität in den Zellkernen}$$

$$\frac{821 \text{ dpm}}{961 \text{ dpm}} \cdot 100 = 85,4 \% \text{ der Radioaktivität im Cytoplasma}$$

b) Da wir 180 min. nach Applikation von $0,1 \mu\text{Ci}$ ($1 \mu\text{g}$) Testosteron- $4-^{14}\text{C}$ mit einem starken Radioaktivitätsabfall in den Zellfraktionen der Vesicular-Drüsen rechnen mußten, und sich außerdem noch die Aktivitätsverteilungen nach Gaben von subphysiologischen und physiologischen Dosen als ähnlich erwiesen hatten, haben wir die Dosierung für diesen Versuch auf $0,2 \mu\text{Ci}$ ($2 \mu\text{g}$) erhöht, wobei wir immer noch im subphysiologischen Bereich des Hormons geblieben sind. Unsere Analysen der Zellfraktionen ergaben folgende Werte:

Gesamtaktivität der Vesicular-Drüsen:	1297 dpm
Aktivität der Zellkerne:	111 dpm
Aktivität des Cytoplasmas:	1186 dpm

$$\frac{111 \text{ dpm}}{1297 \text{ dpm}} \cdot 100 = \underline{8,5 \% \text{ der Radioaktivität in den Kernen}}$$

$$\frac{1186 \text{ dpm}}{1297 \text{ dpm}} \cdot 100 = \underline{91,4 \% \text{ der Radioaktivität im Cytoplasma}}$$

Auch bei diesen Versuchen fanden wir also, wie obige Berechnung der prozentualen Aktivitätsverteilung auf die Zellfraktionen zeigt, eine ausgeprägte Anreicherung der Radioaktivität im Cytoplasma der Vesicular-Drüsen. Eine zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der Zellfraktionierungsversuche gibt die Tab. 4 .

Tab. 4 Absolute und relative Anteile der Kern-Cytoplasma-Fraktion an der Gesamtradioaktivität in Vesicular-Drüsen 30 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten 3 und 180 Minuten nach subcutaner Injektion von $0,1 \mu\text{Ci}$ ($1 \mu\text{g}$) bzw. $0,2 \mu\text{Ci}$ ($2 \mu\text{g}$) Testosteron-4- ^{14}C in $0,2 \text{ ml}$ Propylenglykol/ H_2O 1:1 (Mittelwerte von 60 Tieren).

Zellfraktion	3 Min. ($0,1 \mu\text{Ci}$)		180 Min. ($0,2 \mu\text{Ci}$)	
	dpm	%	dpm	%
Kerne	140	14,6	111	8,6
Cytoplasma	821	85,4	1166	91,4

Diskussion

Wie im theoretischen Teil ausgeführt wurde, lagen zwei Probleme vor, die durch diese Arbeit geklärt werden sollten:

1) Nach den Versuchen von TVETER (5) kommt es etwa zwei bis drei Stunden nach Injektion von radioaktivem Testosteron in erwachsenen kastrierten Ratten zu einer Anreicherung von Radioaktivität in der Prostata gegenüber Blut.

Es war von Interesse zu sehen, ob es auch bei unreifen Ratten zu einer solchen Anreicherung in der Prostata kommt.

2) Gibt es bei Einsatz von Testosteronmengen wie sie bei Östradiol physiologisch wären und daher bei Testosteron als subphysiologisch bezeichnet werden können, eine auffallendere Anreicherung in den akzessorischen Sexualorganen gegenüber Blut als bei Einsatz physiologischer Dosen im Sinne des BUTENAND-Test (19) ?

ad 1) Wie die Abb. 5 erkennen läßt, gibt es keine Anreicherung gegenüber Blut in der Prostata im Verlauf von zwei bis drei Stunden nach Applikation. Die Kurven für die akzessorischen Sexualorgane Prostata und Vesicular-Drüsen zeigen keine Tendenz, einem Maximum zuzustreben. Der Unterschied des Kurvenverlaufes bei kastrierten erwachsenen und unreifen Ratten muß einen physiologischen Grund haben. Wir halten zur Zeit folgende Lösung für möglich: Histoautoradiographische Untersuchungen an Vesicular-Drüsen und Prostata unreifer Ratten haben gezeigt (4,13), daß das Sekret mehr radioaktives Testosteron und radioaktive Metabolite aufnimmt als das übrige Organ. Mengemäßig spielt das Sekret bei den unreifen Tieren allerdings eine untergeordnete Rolle. Es könnte sein, daß bei den erwachsenen Tieren, bei denen Prostata und Vesicular-Drüsen große Mengen Sekret enthalten, eine Anreicherung von Radioaktivität gegenüber Blut in Erscheinung tritt. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß einige

Stunden vergehen, ehe diese Anreicherung des radioaktiven Materials in den akzessorischen Sexualorganen ein Maximum erreicht. Versuche zur Klärung des Problems in diesem Sinne werden zur Zeit noch durchgeführt.

Es muß ausdrücklich daraufhingewiesen werden, daß zwei bis drei Stunden nach Injektion von radioaktivem Testosteron in den akzessorischen Sexualorganen praktisch kein Testosteron mehr vorliegt, sondern fast ausschließlich hochpolare Metabolite vorhanden sind (20). Auch das heute als eigentliches Androgen geltende 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on (5 α -Dihydrotestosteron) ist zwei bis drei Stunden nach Injektion nicht mehr nachweisbar. Die von TVETER et al. beobachtete Anreicherung von Radioaktivität stellt also keine Anreicherung von Testosteron bzw. 5 α -Dihydrotestosteron dar. Es ist daher die Frage, ob das von TVETER beobachtete Maximum physiologische Bedeutung hat. Gegen eine physiologische Bedeutung spricht ferner die Tatsache, daß die ersten Wirkungen des Testosterons an den akzessorischen Sexualorganen, die vor allem den RNA-Stoffwechsel betreffen (12), schon zehn bis dreißig Minuten nach Applikation einsetzen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die von uns beobachtete initiale Anreicherung, die von Testosteron und dem ebenfalls androgenwirkenden 5 α -Dihydrotestosteron bedingt ist (8), eher physiologischen Charakter hat. Das von TVETER beschriebene Maximum unterscheidet sich trotz formaler Ähnlichkeiten auch in anderer Weise von dem, das JENSEN nach Injektion von radioaktivem Östradiol bei weiblichen kastrierten Tieren im Uterus-Endometrium fand (6,9). Bei den Versuchen von JENSEN liegt zur Zeit des Maximums noch unverändertes Östradiol vor.

ad 2) Die Erwartung, mit subphysiologischen Testosteron-Dosen, die denen von Oestrogenen bei weiblichen Tieren entsprechen, eine deutlichere Anreicherung gegenüber Blut zu erzielen, hat sich nicht bestätigt. Das gilt auch für die Erwartung, mit solchen Dosen eine Anreicherung von Radioaktivität in den Ker-

nen gegenüber dem Cytoplasma zu finden. Bei dem Radioaktivitätsanteil im Cytoplasma, der den der Kerne bei weitem übertrifft, handelt es sich also nicht um Material, das als Überschuß zu betrachten ist und vom Kern nicht mehr gebunden werden kann.

Grundsätzlich muß festgehalten werden, daß eine Anreicherung in einer Zellorganelle weder eine notwendige noch eine hinreichende Voraussetzung für das Vorliegen eines entscheidenden physiologischen Wirkortes ist. Andererseits kann man sich nicht gut vorstellen, daß dort, wo Testosteron und seine primären Metaboliten bevorzugt gebunden werden, nichts geschieht. Auf alle Fälle sprechen auch die hier geschilderten Ergebnisse für eine Vorstellung, nach der Steroidhormone allgemein und Testosteron im besonderen einen multilateralen Angriff auf den Zellstoffwechsel durchführen. Es ist notwendig geworden daraufhinzuweisen, daß unsere modernsten biochemischen Erkenntnisse eine Einengung des primären Wirkortes gar nicht zulassen. Das sei am Beispiel der Theorie von Hormonwirkungen als Gen-Aktivierung erläutert. Nach dieser Theorie greifen bestimmte Hormone, wie schon geschildert wurde, an den Histon-Molekülen an, die von der DNA im Kern als Repressoren gebunden werden. Nach neuesten Erkenntnissen russischer Forscher (21) umhüllt sich auch die vom Kern in das Cytoplasma abwandernde messenger-RNA sofort nach ihrer Entstehung mit einer Proteinhülle. Die Partikel, bestehend aus messenger-RNA und Protein, werden als Informosomen bezeichnet. Diese Informosomen wandern zu den Ribosomen und bilden zum Teil deren Baumaterial. Die messenger-RNA enthaltenden Informosomen benötigen ebenso wie die DNA-Histon-Komplexe den Angriff bestimmter Induktoren, damit der Nucleinsäureanteil physiologisch wirksam werden kann. Es ist also eine durchaus vertretbare Hypothese, daß - wenn Steroidhormone schon Induktoren-Charakter haben - diese Eigenschaft innerhalb und außerhalb des Kernes zum Tragen kommt.

Es dürfte dann auch nicht weiter verwundern, daß Bindungen des Hormons innerhalb u n d außerhalb des Kernes beobachtet werden können. Hierbei könnte das eine Hormon mehr den Kern, das andere Hormon mehr das Cytoplasma bevorzugen, etwa in dem Sinne, daß das eine Hormon mehr Induktor bei den Informosomen und das andere mehr Induktor bei den DNA-Histon-Komplexen ist.

Es muß noch hervorgehoben werden, daß der Anteil der Kerne an der gesamten Radioaktivität bei den Drei-Minuten-Versuchen höher lag als bei den Drei-Stunden-Versuchen. Da wenige Minuten nach Injektion, wie oben schon erwähnt, noch wirksame Androgene vorliegen, ist es möglich, daß in diesem Unterschied sich eine gewisse Bedeutung des Kernes für die physiologischen Reaktionen der Androgene widerspiegelt. Andererseits ist eine mit der Zeit zunehmende Bevorzugung des Cytoplasmas mit seinem höheren Wassergehalt verständlich, weil Testosteron immer stärker in polare und damit wasserlösliche Metabolite umgewandelt wird.

Zusammenfassung

Zur Klärung von Widersprüchen zwischen dem Verhalten von Östradiol bei weiblichen Tieren und von Testosteron bei männlichen Tieren sowie zwischen dem Verhalten von Testosteron bei kastrierten erwachsenen und unreifen männlichen Tieren wurden in Fortsetzung früherer Arbeiten weitere Verteilungsstudien durchgeführt. Zum Einsatz kamen dreißig Tage alte männliche Sprague-Dawley-Ratten. Sie erhielten entweder subphysiologische Dosen von Testosteron-4- ^{14}C , $0,1\text{ }\mu\text{Ci}$ ($1\text{ }\mu\text{g}$) oder, wie bei früheren Versuchen, physiologische Dosen dieses Präparates. Bei den subphysiologischen Dosen handelt es sich um Mengen, die bei Östrogenen und weiblichen Tieren als physiologisch bezeichnet werden. Um die Radioaktivitätsverteilung nach Einsatz subphysiologischer Dosen sicher zu erfassen, wurden die ^{14}C -Aktivitäten in Gasphase mit Hilfe eines Antikoinzidenz-Schirmzählrohres und eines Antikoinzidenz-Messverstärkers bestimmt. Die Verteilungsstudien berücksichtigten sehr kurze Zeiten zwischen Injektion und Sektion (3 Minuten), um Werte innerhalb der biologischen Halbwertszeit des Testosterons (4' bis 5 Minuten) zu erhalten. Zur Beurteilung der intrazellulären Verteilung wurden die Vesicular-Drüsen 3 und 180 Minuten nach Injektion subphysiologischer Dosen von Testosteron-4- ^{14}C zellfraktioniert.

Im Einzelnen wurde folgendes festgestellt:

- 1) Die Radioaktivitätsverteilung einiger ausgewählter Organe (Leber, Vesicular-Drüsen, Prostata, Hoden und Blut) ist unabhängig von der Wahl der Dosis.
- 2) Lediglich sehr kurze Zeit nach Injektion läßt sich in Prostata und Vesicular-Drüsen eine Anreicherung gegenüber Blut beobachten, die bis zum Vierfachen betragen kann, allerdings schnell abfällt. Das bei erwachsenen kastrierten Tieren auftretende Maximum zwei bis drei Stunden nach

Injektion fehlt bei den unreifen Ratten. In der Diskussion wird eine Deutung dieses Unterschiedes versucht. Es sei besonders herausgestellt, daß die von uns beobachtete Anreicherung im Gegensatz von der bei erwachsenen kastrierten Tieren auftretenden Anreicherung zu einem Zeitpunkt vorliegt, zu dem noch nicht metabolisiertes Testosteron überwiegt.

- 3) Auch kurze Zeit nach Injektion des radioaktiv -markierten Testosterons enthält das Cytoplasma der Vesicular-Drüsen den Hauptanteil des radioaktiven Materials. Im Kern befinden sich etwa nur 15%, im Cytoplasma 85%. Drei Stunden nach Injektion ist der Anteil des Kerns noch kleiner (8%).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen eher für einen kombinierten Angriff des Testosterons in Kern u n d Cytoplasma, als für einen selektiven Angriff.

Literaturverzeichnis

1. NEHER R. in: Das Testosteron-Die Struma, S.1, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1968
2. WIEST W.G., J. biol. Chem. 238, 94 (1963)
3. DIRSCHERL W. u. MOSEBACH K.-O., Acta endocrinol. 36, 115(61)
4. MOSEBACH K.-O., JÜHE H. u. DIRSCHERL W., Acta endocrinol. 54, 557 (1967)
5. TVETER K. in: Research on Steroids, Vol. III, 1967
6. JENSEN E.V. and JACOBSON H.J., Recent Progr. Hormone, Res. 18, 387 (1962)
7. STUMPF W.E. and ROTH L.J., J. of Histochemistry and Cytochemistry, 14, 274 (1966)
8. BRUSCHOVSKY N. and WILSON J.O., J. biol. Chem., 243, 2012(68)
9. JENSEN E.V. in: Proceedings of The Second International Congress of Endocrinology (London) Part I, S.427 Excerpta Medica Foundation, 1965
10. MOSEBACH K.-O., DIRSCHERL W. u. EL-ATTAR T., Acta endocrinol. 44, 416 (1963)
MOSEBACH K.-O., DIRSCHERL W. u. EL-ATTAR T., Acta endocrinol. 45, 437 (1964)
11. HAMILTON T.H., WICHNELL C.C. and TATA J.R., J. biol. Chem. 243, 408 (1968)
12. WICKS W.D., GREENMAN D.L. and KENNEY F.T., J. biol. Chem. 240, 4414 u. 4420 (1965)
13. MOSEBACH K.-O. in: Das Testosteron-Die Struma, S. 17, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1968
14. MOSEBACH K.-O., R. LIPPOLIT u. R. SCHNEIDER in :Östrogene-Hypophysentumoren, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1969, im Druck
15. PEARLMAN W.H., CIBA Found. Coll. Endocr. 11, 233 (1957)
16. ALLFREY V. in: Brachet J. & Mirsey A.E., The Cell, Vol.I, Academic Press 193 (1959)
17. WEICHSELBAUM T.E., Amer. J. clin. Path. 10, 40 (1946)

18. SIMON H., DANIEL H. u. KLEBE K., Angew. Chem., 71, 303 (1959)
19. BÜTENANDT A., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 322, 28 (1960)
20. MOSEBACH K.-O., RIECK G. u. LIPPOLDT R., in Vorbereitung
21. SPIRIN A.S., 6 th FEBS meeting, Madrid 11.4.1969

An dieser Stelle möchte ich Herrn
Prof. Dr. K.-O. M o s e b a c h
für die Überlassung des Themas und
seine väterliche Beratung während
der Anfertigung dieser Arbeit herzlich danken.

Lebenslauf

Am 12.9.1941 wurde ich als Sohn des Juristen Karl-Wilhelm K l e y und seiner Ehefrau Ruth geb. Gravenstein in Berlin geboren. Nach dem Tode meiner Eltern kam ich 1943 zu meinen Großeltern zuerst nach Kiel und später nach Halle /W. Dort wurde ich 1948 in die Volksschule eingeschult, die ich nach vierjährigem Besuch verließ, um die dortige Realschule zu besuchen. 1955 wurde ich auf das Staatliche Aufbau Gymnasium mit Internat in Detmold umgeschult, wo ich im Februar 1961 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1961 begann ich mein Studium an der Universität Hamburg. Zunächst habe ich Musik, Musikwissenschaft und Psychologie studiert. Im Sommersemester 1963 wechselte ich mein Studienfach und habe an der Universität Bonn Humanmedizin studiert. Dort legte ich im Wintersemester 1963/64 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Sommersemester 1965 die ärztliche Vorprüfung ab. 1967 wechselte ich zur Universität Heidelberg über und beendete dort am 13.12.1968 mein Studium mit dem Staatsexamen. Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent am Knappschafts-Krankenhaus Bardenberg/Aachen.

